

Identificación de rizobacterias aisladas de *Tagetes coronopifolia* y *Tagetes terniflora* (Cempasúchitl) y evaluación de su capacidad inhibitoria *in vitro* contra microorganismos fitopatógenos

Identification of rhizobacteria isolated from *Tagetes coronopifolia* and *Tagetes terniflora* (Marigold) and evaluation of their *in vitro* inhibitory capacity against phytopathogenic microorganisms

Castillo-Ortega LS, Mercado-Flores Y, Téllez-Jurado A, Anducho-Reyes MA*

Laboratorio de Agrobiotecnología, Departamento de Biotecnología, Universidad Politécnica de Pachuca, carretera Pachuca – Cd. Sahagún, km. 20, Rancho Luna, Ex Hacienda de Sta. Bárbara, C.P. 43830. Zempoala, Hidalgo, México.

RESUMEN

El género *Tagetes* representa un grupo de plantas conocidas comúnmente como cempasúchil o flor del muerto, las cuales son reconocidas principalmente por su uso en la industria alimentaria, horticultura ornamental, terapéutico herbolario y cultural. *Tagetes coronopifolia* y *terniflora* son dos especies de este género, empleadas en la rotación de cultivos para el control de nemátodos fitopatógenos. En este trabajo se aislaron 581 cepas de rizobacterias a partir de suelo rizosférico, suelo adherido a la superficie de la raíz y el interior de la raíz de la planta a los 30, 60, 90 y 120 días de crecimiento en cultivos de invernadero. Del total de cepas aisladas de rizobacterias, 22 presentaron actividad antagonista contra *Fusarium* sp., 53 contra *Stenocarpella maydis*, ambos hongos patógenos de maíz, mientras que 37 cepas mostraron antagonismo contra la bacteria fitopatógena *Clavibacter michiguenses* subsp. *michiganensis*. De acuerdo con el porcentaje de inhibición de los patógenos en estudio, se seleccionaron 10 rizobacterias para la identificación molecular de una secuencia parcial del gen ADN_r 16S. Las secuencias parciales de cada rizobacteria fueron analizadas por similitud en el GenBank mostrando como resultado que pertenecen a los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*, los cuales son utilizados como agentes de biocontrol.

Palabras clave: rizobacterias, bacterias endófitas, control biológico, plantas antagonistas.

ABSTRACT

The genus *Tagetes* represents a group of plants commonly known as marigold or "flower of the dead", which are mainly recognized for their use in the food industry, ornamental horticulture, therapeutic herbalism, and culture. *Tagetes coronopifolia* and *terniflora* are two plant species of this genus, which are used for crop rotation and control of phytopathogenic nematodes. In this work, 581 rhizobacteria strains were isolated from samples of rhizosphere soil, soil attached to the root surface and inside of plant root at 30, 60, 90 and 120 days of growth in greenhouse cultures. Twenty-two strains showed antagonistic activity against *Fusarium* sp. and 53 against *Stenocarpella maydis*, which are pathogenic fungi in corn, while 37 strains showed antagonism against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. According

to the percentage of inhibition of the phytopathogens, 10 rhizobacteria were selected for molecular identification of the partial 16S rDNA gene. The partial sequences of each rhizobacteria were analyzed for similarity in the GenBank, showing as a result that they belong to the *Bacillus* and *Pseudomonas* genera, which are used as biocontrol agents.

Keywords: rhizobacteria, endophytic bacteria, biological control, antagonistic plants.

INTRODUCCIÓN

Las plantas del género *Tagetes* L. (familia Asteraceae) se clasifican taxonómicamente en 53 especies herbáceas anuales y perennes. Son nativas de América y varias de sus especies silvestres tienen una amplia distribución geográfica desde el suroeste de Estados Unidos hasta Argentina (Loockerman *et al.*, 2003; Cicevan *et al.*, 2016). En México, se estima que habitan alrededor del 50% de las especies, además de considerarse como su centro geográfico de origen y diversidad (García-Sánchez *et al.*, 2012).

Varias especies de estas plantas son agroeconómicamente importantes, debido a su uso en la industria alimentaria, horticultura ornamental, terapéutico herbolario y cultural (García-Sánchez *et al.*, 2012). Adicionalmente, también han adquirido importancia en el ámbito del control biológico, debido a que el conocimiento empírico y de investigación han demostrado que algunas especies de estas plantas en crecimiento (Miller y Ahrens, 1969), sus residuos vegetales (Siddiqui y Alam, 1987) o los extractos de sus raíces (Hoan y Davide, 1979), son eficaces para controlar y reducir significativamente las poblaciones de nemátodos (Hooks *et al.*, 2010), hongos (Mares *et al.*, 2004) y bacterias (Gakuubi *et al.*, 2016) fitopatógenas en suelo, tanto en condiciones de invernadero y campo abierto (Topp *et al.*, 1998; Sturz y Kimpinski, 2004). Esta propiedad de control biológico se relaciona con la actividad alelopática de diversos metabolitos secundarios como acetilenos, carotenoides, flavonoides, terpenoides, alcaloides y tiofenos (Salehi *et al.*, 2018), que son producidos y contenidos en flores, hojas, tallos, raíz y exudados. No obstante a esta actividad antagonista y sus exudados rizosféricos, un fenómeno interesante y poco estudiado ha sido que estos metabolitos secundarios modifican relativamente la densidad total y la biomasa de las poblaciones microbianas autóctonas en la

rizosfera de estas plantas (Qu *et al.*, 2021; Cheng *et al.*, 2022), argumentándose inclusive, que estos compuestos alelopáticos podrían inducir un proceso de mitigación microbiana o exacerbación reducida para moldear el microbioma rizosférico (Siebers *et al.*, 2018; David *et al.*, 2018). Estas interacciones positivas, entre rizobacterias y su planta huésped, podrían ser una alternativa para la búsqueda, aislamiento, identificación y uso de bacterias que contribuyan a la supresión natural o inducida de enfermedades transmitidas por diversos microorganismos fitopatógenos en suelo y por consecuencia, mejorar la salud vegetal (Zuo *et al.*, 2014; Xiao *et al.*, 2019), con lo cual, se aseguraría el rendimiento competitivo de los cultivos y se garantizaría la protección y seguridad ambiental para mantener el equilibrio ecológico a largo plazo en los agroecosistemas (Majeed *et al.*, 2018).

Bajo este contexto, en este trabajo, se emplearon las plantas alelopáticas *T. coronopifolia* y *T. terniflora* con el objetivo de aislar y caracterizar morfológicamente bacterias nativas de su rizósfera, para posteriormente evaluar *in vitro* su potencial antagónico contra los microorganismos fitopatógenos del maíz *S. maydis*, *Fusarium* sp., y la bacteria patógena de jitomate *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*). Finalmente, las cepas con potencial antagonista se identificaron molecularmente mediante el análisis de la secuencia del gen ADNr 16S.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo de plantas en condiciones de invernadero

La germinación de las dos especies de *Tagetes* se realizó con 10 a 12 semillas sobre soportes de papel filtro estéril humedecidos con agua destilada estéril y en bases de cajas de Petri (100 x 15 mm). Las bases de cajas Petri se colocaron sobre una charola de plástico con algodones humedecidos con una solución de glicerol al 50 % y cubierta con papel celofán. Las semillas, bajo estas condiciones, se expusieron a la luz solar natural durante 12 h a temperatura ambiente, hasta la germinación. Una vez observado el brote en cada una de las semillas, se contaron 14 días para posteriormente sembrar las plántulas en macetas de 50 cm de diámetro y 45 cm de alto a $\frac{3}{4}$ de su capacidad con suelos con cargas microbianas disminuidas por un proceso de esterilización a 121 °C y 15 lb por 1 h, el cual se repitió tres veces cada 24 h y que fueron colectados en un campo experimental de la Universidad Politécnica de Pachuca (N 19°58'50", O 98°41'06", 2,375 msnm). Las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero durante los 120 días de muestreo. Las semillas de *T. coronopifolia* y *T. terniflora* fueron donadas por el Dr. Miguel Angel Serrato Cruz, del departamento de Recursos Genéticos y Agricultura Regional de la Universidad Autónoma Chapingo.

Muestreo de suelos rizosféricos y aislamiento de rizobacterias

Se seleccionaron al azar plantas de cada una de las especies de *Tagetes* y se colectó su suelo rizosférico a los 30, 60, 90 y 120 días de su crecimiento, para esto, se utilizó una

espátula estéril, se marcó alrededor del tallo de las plantas seleccionadas un cuadrado de 10 cm por lado y se sacudió para extraer el suelo rizosférico y obtener las raíces de la planta. El material biológico, se colocó en bolsas de poliestireno estériles y se almacenaron a -78 °C. Tres diferentes zonas fueron empleadas para el aislamiento de las rizobacterias; i) suelo rizosférico; ii) suelo adherido a la superficie de la raíz y iii) el interior de la raíz de la planta. La metodología empleada para la primera zona consistió en pesar y mezclar 10 g de suelo rizosférico en 90 ml de solución de peptona y fosfato buffer salino (K_2HPO_4 , 1.21 g; KH_2PO_4 , 0.34 g, 1000 mL de H_2O destilada, pH 7.4). Para la segunda zona, se pesaron 10 g de raíces de cada una de las plantas seleccionadas y se colocaron en solución de peptona y fosfatos con agitación vigorosa por 10 min. En la tercera zona se pesaron 5 g de raíces de cada una de las plantas y se lavaron tres veces con agua destilada estéril, después se colocaron en una solución de etanol al 70 % (v/v) durante 5 min, y pasado este tiempo, se sumergieron en una solución de NaClO al 6.25 % (v/v) durante 10 min, seguido de 15 s en una solución de H_2O_2 al 10 % (v/v). Las raíces se enjuagaron de 3 a 4 veces con agua destilada estéril y se trituraron en mortero estéril con una solución de $MgSO_4$ 0.01 M, para finalmente diluirse hasta un volumen de 100 mL con solución de $MgSO_4$ 0.01 M. De las soluciones que contenían el suelo rizosférico, las raíces y el macerado de las raíces se hicieron diluciones seriadas de 10^{-2} hasta 10^{-8} para tomar 100 μ L de cada una y sembrarlas por extensión en medio de agar King B y agar Triptocaseina y Soya (DIBACO). Las placas se incubaron a $28 \pm 2^\circ C$ durante 48 h. Cuando se observó crecimiento bacteriano de las muestras colectadas y procesadas de las dos especies de *Tagetes* en las diferentes zonas y a los 30, 60, 90 y 120 días de su crecimiento, las colonias con morfotipos diferente se aislaron por resiembra hasta obtener cultivos axénicos. Una vez puros, se realizó la caracterización morfológica, microscópica y tinción de Gram. Finalmente, las rizobacterias se conservaron a -20 °C en 0.5 mL de caldo Triptocaseina y Soya (MP biomedical) y 0.5 mL de glicerol al 50 % estéril (v/v). La nomenclatura utilizada para identificar cada una de las cepas aisladas constó de un código alfanumérico de cinco caracteres. El primer carácter representó el tiempo de muestreo en días para cada especie, *T. coronopifolia* (8:30, 4:60, 2:90, 6:120), *T. terniflora* (1:30, 3:60, 5:90, 7:120); el segundo carácter indicó el medio de cultivo utilizado para su aislamiento, B: King-B, T:TSA; el tercer carácter indicó la especie de *Tagetes* de aislamiento T:*terniflora*, C:*coronopifolia*; el cuarto carácter indica la zona de muestreo, R: Suelo rizosférico, E: Suelo adherido a la superficie de la raíz, I: Interior de la raíz de la planta; y el último carácter es el número de cepa.

Microorganismos fitopatógenos

La cepa de *Cmm* fue donada por la M. C. Ma. De Lourdes Rodríguez Mejía del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma de Chapingo (Rodríguez-Mejía, 2013). La cepa de *S. maydis* fue donada por el Dr. Daniel Jeffers del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y

Trigo (CIMMyT) (Jeffers, 1995), mientras que la cepa de *Fusarium* sp., fue aislada en el laboratorio de Agrobiotecnología de la Universidad Politécnica de Pachuca a partir de granos de maíz y mazorcas en pudrición. Los materiales vegetales para el aislamiento de *Fusarium* sp. fueron obtenidos de cultivos de maíz de la localidad de Cinta Larga en el municipio de Mixquiahuala, Hidalgo, México.

Pruebas de enfrentamiento dual para *S. maydis* y *Fusarium* sp.

La selección de las bacterias antagónicas se realizó mediante pruebas de enfrentamiento dual empleando el protocolo descrito por Hernández *et al.* (2010). Las inhibiciones del crecimiento de los hongos fitopatógenos se observaron para *Fusarium* sp., a los 10 días de incubación y para *S. maydis* en un rango de 5 a 7 días de incubación. Las bacterias aisladas de ambas especies de *Tagetes*, en las diferentes zonas y a los 30, 60, 90 y 120 días de su crecimiento que generaron un halo de inhibición, fueron seleccionadas y sometidas a pruebas confirmativas por triplicado siguiendo la metodología antes descrita y midiendo los halos de inhibición en mm. El índice de inhibición se estimó empleando la siguiente ecuación, Porcentaje de Inhibición (%) = $(C-E)/C \times 100$, en donde, C es el crecimiento radial del fitopatógeno en el control (mm) y E representa el crecimiento radial del fitopatógeno en el tratamiento (mm).

Pruebas de enfrentamiento dual para *Cmm*

Las pruebas de enfrentamiento dual para la cepa *Cmm* se realizaron con la técnica de difusión en agar modificada de Reinoso *et al.* (2006). Las bacterias aisladas de las diferentes zonas en ambas especies de *Tagetes* y a los 30, 60, 90 y 120 días de su crecimiento que presentaron un halo de inhibición, se seleccionaron y se sometieron a pruebas confirmativas por triplicado de enfrentamiento dual en agar nutritivo. En estas pruebas confirmativas, se hizo la difusión de *Cmm* en agar nutritivo, mientras que por separado las rizobacterias identificadas como antagónicas se crecieron previamente en agar nutritivo durante 24 h. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se cortaron discos de agar de 7 mm de diámetro y se colocaron sobre el cultivo de *Cmm* para incubarse a 28 °C por 24 - 48 h. En cada uno de los halos de inhibición se midió el radio en mm y se estimó el porcentaje de inhibición.

Extracción de ADN, amplificación y secuenciación

El ADN genómico de cada una de las rizobacterias con capacidad inhibitoria fue extraído a partir de la biomasa de cultivos en caldo nutritivo (BD Bioxon, México) incubados a 28 °C durante 24 h. Las rizobacterias se concentraron por centrifugación a 12000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se decantó y de la pastilla celular se obtuvo el ADN genómico empleando la técnica de CTAB modificada de von der Schulenburg *et al.* (2001). Las condiciones de amplificación por PCR del gen ADNr16S parcial fueron las propuestas por Lane (1991) en un volumen total de 50 µL y con los primers universales 8F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' y 1492R:

5'-GTTACCTTGTTACGACTT-3'. Los productos de PCR se purificaron con el kit comercial PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos de PCR purificados se secuenciaron en ambas cadenas con los iniciadores universales 8F y 1492R, utilizando el servicio externo que ofrece el Colegio de Posgraduados con un secuenciador de 4 capilares 3130 Genetic Analyzer Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). Una vez obtenidas las secuencias parciales estas fueron editadas manualmente en los programas Chromas v.2.6.6 (Technelysium; <http://technelysium.com.au/wp/chromas/>) y BioEdit v.7.0.0 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) y analizadas por similitud con el algoritmo BLASTN en la base de datos del GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las secuencias fueron depositadas en el GenBank con los números de acceso del ON088984 al ON088993.

Análisis estadístico

El análisis del efecto de las variables, tiempo de crecimiento de las plantas, las diferentes zonas de aislamiento de rizobacterias y la especie de la planta se realizó mediante una prueba de independencia con Ji-cuadrada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de Rizobacterias

Un total de 581 rizobacterias fueron aisladas, de las cuales, 274 cepas se obtuvieron de la rizosfera de *T. coronopifolia*, mientras que 307 se aislaron de *T. terniflora*. La Tabla 1, muestra el número de bacterias conforme a la zona de aislamiento, la especie y edad de la planta. López-López *et al.* (2017) analizaron mediante técnicas de electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE) los perfiles moleculares de las comunidades bacterianas rizosféricas de *Tagetes terniflora*, *T. remotiflora* y *T. coronopifolia* a los 3, 30, 60 y 90 días, utilizando muestras de suelo rizosférico en condiciones de invernadero. Los resultados de los índices de diversidad (Shannon's index) indicaron una disminución de la diversidad bacteriana conforme se incrementaba el tiempo, mientras que, respecto a la especie de la planta, la mayor diversidad se observó en *T. terniflora* (López-López *et al.*, 2017). En general, varios trabajos de investigación, relacionados con el estudio de la estructura poblacional microbiana rizosférica, indican que la raíces de las plantas mantienen una interacción directa con las comunidades microbianas, es decir, la secreción de exudados rizosféricos o rizodepósitos, los cuales contienen iones solubles en agua, compuestos de bajo peso molecular como azúcares, aminoácidos, flavonoides, proteínas, ácidos grasos, antimicrobianos, nematocidas y otros metabolitos secundarios, así como compuestos de alto peso molecular, que incluyen carbohidratos, proteínas, lípidos, mucílagos insolubles y restos de células lisadas o muertas influyen directa y específicamente en la estructura y función de estas comunidades microbianas (Doornbos *et al.*, 2012; Haldar y Sengupta, 2015). Adicionalmente, la edad y genotipo de la planta, así como otros factores bióticos y abióticos, influyen

Tabla 1. Número de bacterias aisladas de la rizosfera de *T. coronopifolia* y *T. terniflora*, de acuerdo con la especie, edad de cada planta y las diferentes zonas de muestreo.

Table 1. Number of bacteria isolated from *T. coronopifolia* and *T. terniflora* rhizosphere, according with the species, age of each plant and different sampling areas.

TIEMPO (DÍAS)	<i>T. coronopifolia</i>			<i>T. terniflora</i>		
	Zonas de aislamiento			Zonas de aislamiento		
	SUELO RIZOSFÉRICO	SUELO ADHERIDO A LA SUPERFICIE DE LA RAÍZ	INTERIOR DE LA RAÍZ DE LA PLANTA	SUELO RIZOSFÉRICO	SUELO ADHERIDO A LA SUPERFICIE DE LA RAÍZ	INTERIOR DE LA RAÍZ DE LA PLANTA
30	36	29	8	36	36	10
60	38	29	8	45	26	10
90	36	27	8	36	36	7
120	22	26	7	27	27	11
Total			274			307

en la calidad y cantidad de los rizodepositos e imponen una presión selectiva, generando una distribución no aleatoria en frecuencia, abundancia y funciones de las comunidades microbianas a nivel horizontal como vertical a través del perfil del suelo (Micallef *et al.*, 2009; Philippot *et al.*, 2013).

Pruebas de enfrentamiento dual *Stenocarpella maydis*, *Fusarium sp* y *Cmm*.

Los resultados de las pruebas de enfrentamiento dual *in vitro* permitieron seleccionar 53 cepas de rizobacterias que inhibieron el crecimiento de *S. maydis* así como 22 cepas que inhibieron el crecimiento de *Fusarium sp*. (Figura 1). Sin embargo, una selección más rigurosa permitió identificar cepas con rangos de porcentajes de inhibición entre 70 y 100%. Para *S. maydis* se seleccionaron las cepas 5TTE1 (70.83

%), 5BTI1 (71.67 %), 1BTI2 (72.5 %), 1BTE13 (80.83 %), 2TCE11 (87.5 %), 1BTE9 (88.33 %) y 2BCR17 (100 %), mientras que para *Fusarium sp*. se seleccionaron las cepas 1BTI1 (70.83 %), 1TTE12 (75.00 %), 2TCR14 (75.00 %), 1BTI2 (79.17 %) y 1BTR3 (87.5 %) (Figura 3). Las pruebas de enfrentamiento dual para *Cmm* permitieron identificar 38 cepas con capacidad inhibitoria (Figura 2). Se seleccionaron cepas con rangos de porcentaje de inhibición entre 70 y 100 % y que correspondieron a 6TCR11 (61.67 %), 4TCR11 (78.33 %), 1BTI1 (95.83 %) y 3TTR10 (100 %) (Figura 2).

El análisis de los resultados de la selección de cepas con rangos de porcentaje de inhibición entre 70 y 100 %, demostró con base al criterio de especie de planta, que la mayor cantidad de cepas bacterianas con potencial antagonico se aislaron de la rizosfera de *T. terniflora* (Figura 3a).

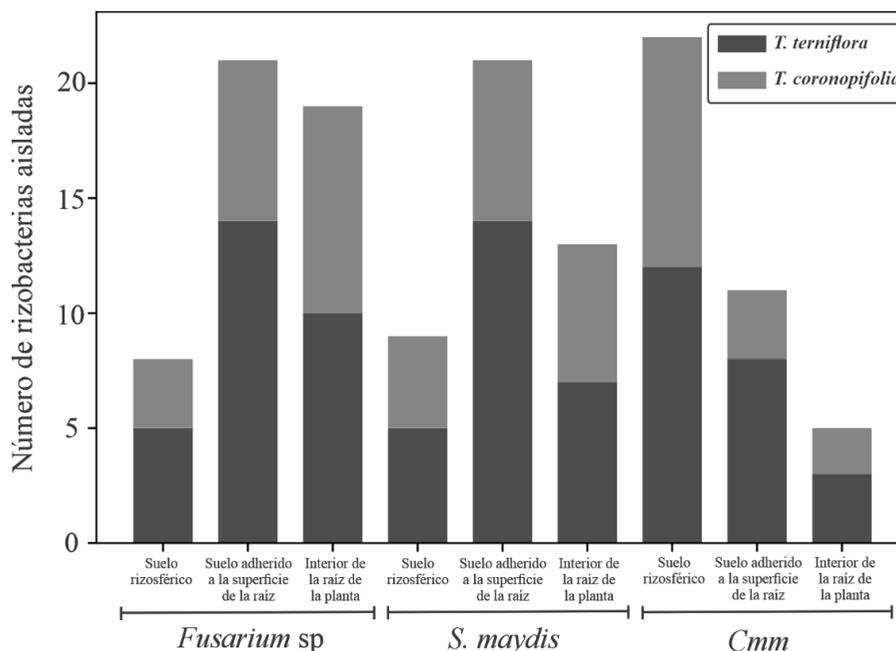


Figura 1. Gráfico de barras apiladas de las bacterias antagonicas aisladas de la rizósfera de *T. coronopifolia* y *T. terniflora* con capacidad inhibitoria de fitopatógenos.

Figure 1. Stacked bar graph of antagonistic bacteria isolated from rhizosphere of *T. coronopifolia* and *T. terniflora* with phytopathogen inhibitory capacity.

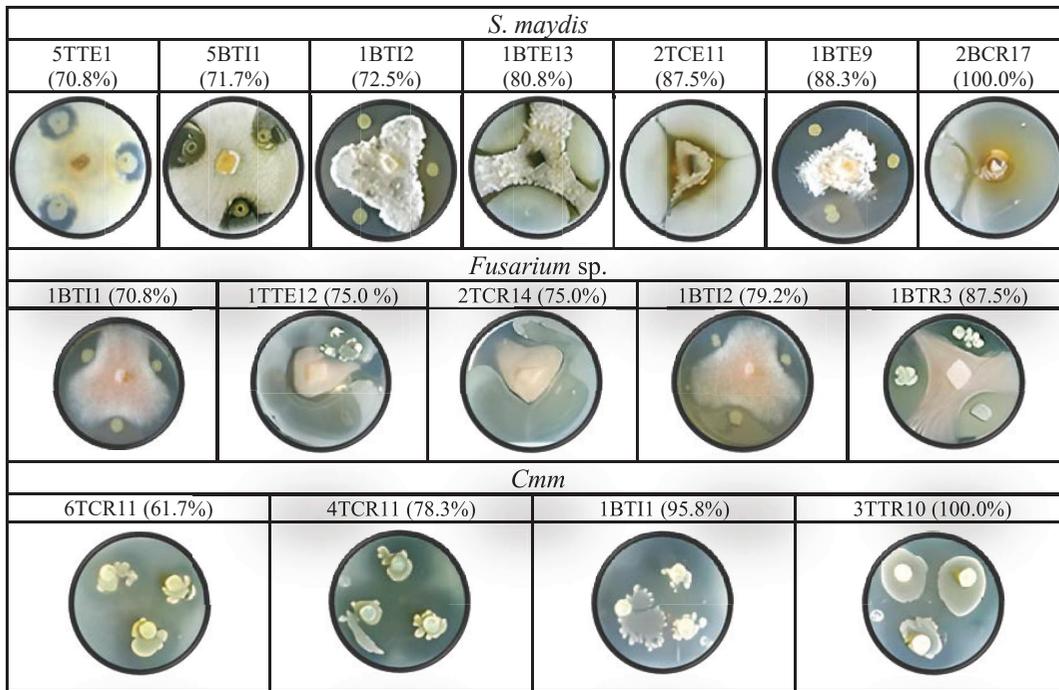


Figura 2. Capacidad antagonística de las bacterias aisladas de la rizósfera de *T. coronopifolia* y *T. terniflora*.
Figure 2. Antagonistic capacity of bacteria isolated from *T. coronopifolia* and *T. terniflora* rhizosphere.

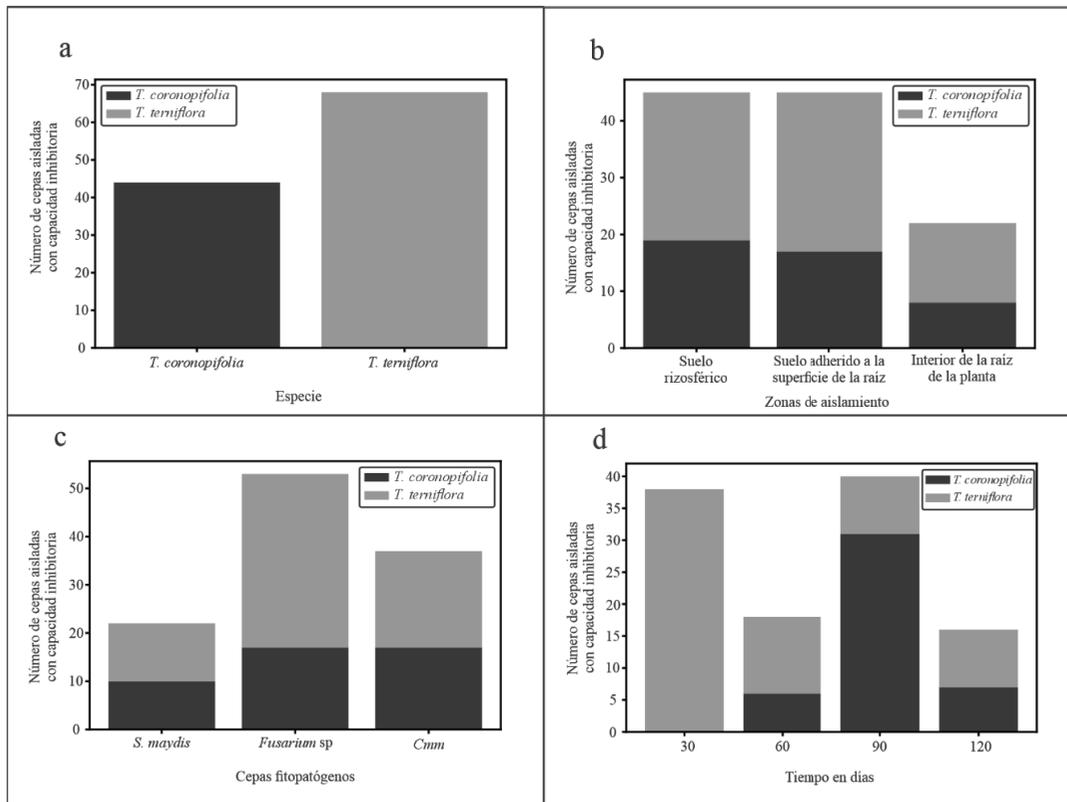


Figura 3. Número de rizobacterias con potencial antagonístico frente a los patógenos *Fusarium sp.*, *S. maydis* y *Cmm*; a) Número de bacterias antagonísticas de acuerdo con la especie de la planta; b) número de bacterias de acuerdo con las tres diferentes zonas de aislamiento de las rizobacterias; c) número de bacterias antagonísticas de acuerdo con el criterio de especie de planta y el fitopatógeno en estudio; d) número de bacterias de acuerdo con el tiempo de crecimiento de la planta.

Figure 3. Number of rhizobacteria with antagonistic potential against the pathogens *Fusarium sp.*, *S. maydis* and *Cmm*; a) Number of antagonistic bacteria according to plant species; b) number of bacteria from the three different zones of rhizobacteria isolation; c) number of antagonistic bacteria according to criteria of plant species and the phytopathogens under study; d) number of bacteria according to the growth time of the plant.

Asimismo, considerando las zonas de aislamiento y tiempo de crecimiento, sin importar la especie de la planta, la mayor cantidad de bacterias antagonicas se obtuvieron del suelo rizosférico y del suelo adherido a la superficie de la raíz (Figura 3b) y a los 30 y 90 días de crecimiento (Figura 3d). Finalmente, las rizobacterias antagonicas presentaron mayor eficiencia de inhibición sobre el hongo fitopatógeno *Fusarium* sp., en comparación con el hongo *S. maydis* (Figura 3c).

Las pruebas de independencia de Ji-cuadrada para los enfrentamientos duales entre fitopatógenos y rizobacterias, considerando las variables, especie de planta, el tiempo de crecimiento de la planta y las tres diferentes zonas de aislamiento de las rizobacterias, demostraron que la capacidad inhibitoria de los aislados obtenidos de *T. coronopifolia* y *terniflora* fueron estadísticamente significativas para aceptar la hipótesis nula (H_0) "el tiempo de crecimiento de la planta y el sitio de aislamiento de las rizobacterias con capacidad inhibitoria son independientes" (*Fusarium* sp., $p = 0.001809$; *S. maydis*, $p = 2.44E-05$; *Cmm*, $p = 0.001057$).

Identificación molecular de las rizobacterias con capacidad inhibitoria de fitopatógenos.

Empleando criterios de selección más rigurosos, que implicaron mayores porcentajes de inhibición hacia *Cmm* y la inhibición hacia uno o ambos hongos fitopatógenos, se logró elegir a 10 rizobacterias (Figura 4), de las cuales, seis cepas fueron aisladas de *T. terniflora* a los 30, 60, 90 y 120 días de suelo rizosférico y adherido a la superficie de la raíz, así como del interior de la raíz y 4 cepas fueron aisladas de *T. coronopifolia* a los 60, 90 y 120 días de suelo adherido a la superficie de la raíz e interior de la raíz. Un análisis de similitud de las secuencias ADNr 16S obtenidas de las 10 rizobacterias, empleando el algoritmo BLASTN del NCBI, demostró que 7 secuencias se alineaban con cepas del género *Bacillus*, específicamente las cepas 2TCI1, 5TTE1, 7TTE11 y 1BTE9 a la especie *subtilis*, las cepas 2BCR17 y 4TCE16 a la especie *B. amyloliquefaciens*, mientras que la cepa 6TCE22 correspondió a la especie *B. atrophaeus* (Tabla 2). Las tres secuencias restantes, se alinearon con cepas del

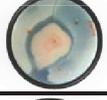
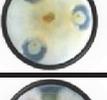
Rizobacteria	<i>S. maydis</i>	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Cmm</i>
1BTE9	 P.I.: 88.3 ± 6.3	 P.I.: 0.0	 P.I.: 37.5 ± 0.0
1BT11	 P.I.: 54.1 ± 9.0	 P.I.: 70.8 ± 7.2	 P.I.: 95.8 ± 7.3
1BT12	 P.I.: 72.5 ± 2.5	 P.I.: 79.2 ± 16.3	 P.I.: 51.7 ± 10.13
2BCR17	 P.I.: 100.0 ± 0.0	 P.I.: 62.5 ± 0.0	 P.I.: 0.0
2TCI1	 P.I.: 62.5 ± 12.5	 P.I.: 64.2 ± 10.1	 P.I.: 0.0
3TTR11	 P.I.: 52.5 ± 4.0	 P.I.: 51.2 ± 7.2	 P.I.: 100.0 ± 0.0
4TCE16	 P.I.: 26.7 ± 9.5	 P.I.: 0.0	 P.I.: 28.3 ± 1.4
5TTE1	 P.I.: 70.8 ± 2.9	 P.I.: 54.2 ± 7.2	 P.I.: 0.0
6TCE22	 P.I.: 21.7 ± 1.4	 P.I.: 0.0	 P.I.: 28.3 ± 1.4
7TTE11	 P.I.: 65.8 ± 3.8	 P.I.: 67.5 ± 2.5	 P.I.: 0.0

Figura 4. Estimación de los porcentajes de inhibición de rizobacterias con capacidad antagonica.
Figure 4. Estimation of inhibition percentages of rhizobacteria with antagonistic capacity.

Tabla 2. Análisis BLASTN empleando secuencias de la región ADNr 16S de 10 rizobacterias con capacidad antagonista a microorganismos fitopatógenos.**Table 2.** BLASTN analysis using sequences of 16S DNAr from 10 rhizobacteria strains with antagonistic capacity to phytopathogenic microorganisms.

Cepa	Número de acceso GeneBank	Tamaño (pb)	Hit	Porcentaje de identidad	Cobertura	E value
1BTE9	ON088988	971	<i>Bacillus subtilis</i>	100	100	2e-79
1BT11	ON088991	740	<i>Pseudomonas protegens</i>	100	100	0.0
1BT12	ON088992	740	<i>Pseudomonas protegens</i>	100	100	0.0
2BCR17	ON088989	971	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100	100	0.0
2TC11	ON088984	971	<i>Bacillus subtilis</i>	99.69	100	0.0
3TTR11	ON088993	740	<i>Pseudomonas sp.</i>	100	100	0.0
4TCE16	ON088985	740	<i>Bacillus subtilis</i>	99.79	100	0.0
5TTE1	ON088987	971	<i>Bacillus sp.</i>	100	100	0.0
6TCE22	ON088990	970	<i>Bacillus atrophaeus</i>	100	100	0.0
7TTE11	ON088986	971	<i>Bacillus subtilis</i>	100	100	0.0

género *Pseudomonas*, específicamente 1BT11, 1BT12 con la especie *P. protegens* y 3TTR11 como sp. (Tabla 2). El género *Bacillus* se caracteriza por incluir una importante variedad de especies bacterianas no patógenas y con propiedades antagonistas, son fáciles de cultivar y eficientes en el control de plagas y enfermedades (Berg et al., 2005). Se ha documentado que *Bacillus* spp., poseen mecanismos antagonistas que involucran competencia por espacio y nutrientes (Handelsman y Stabb, 1996), antibiosis (Loeffler et al., 1986), así como la promoción del crecimiento y la inducción de resistencia en plantas (Kloepper y Ryu, 2006). Adicionalmente, *Bacillus* spp., forma esporas, permitiéndole sobrevivir y permanecer metabólicamente activo en condiciones hostiles, haciéndolo apropiado para formular productos viables y estables para su uso en el biocontrol. Cawoy et al. (2011) demostraron la capacidad inhibitoria de *Bacillus* spp. hacia organismos fitopatógenos como *Verticillium*, *Pythium*, *Cercospora*, *Colletotrichum*, *Alternaria*, *Ascochyta*, *Macrophomina*, *Myrothecium*, *Ramularia*, *Xanthomonas* y *Erysiphe*. La cepa 1BTE9, la cual fue identificada como *B. subtilis*, mostró la capacidad de inhibir a *Cmm*. Utkhede y Koch (2004) reportaron nula incidencia de *Cmm* en cultivos de tomate en invernadero al utilizar tratamientos con productos formulados con *B. subtilis* y *Trichoderma harzianum* aplicados por aspersión en diferentes concentraciones celulares. Asimismo, esta cepa junto con 2TC11, 5TTE1 y 7TTE11 presentaron la capacidad en común de inhibir al hongo *S. maydis*. Petatán-Sagahón et al. (2011) lograron aislar e identificar una cepa de *Bacillus subtilis* (160) de suelos rizosféricos agrícolas y las pruebas de enfrentamiento *in vitro* y en campo demostraron que la bacteria y sus extractos celulares inhibieron el desarrollo de *Stenocarpella maydis* y *macrospora*. A las rizobacterias identificadas molecularmente, como *B. amyloliquefaciens* y *B. atrophaeus* (2BCR17, 4TCE16 y 6TCE22), se les atribuyen características de control biológico semejantes a *B. subtilis*. Yoshida et al. (2001) aislaron una cepa de *B. amyloliquefaciens* capaz de inhibir hongos y bacterias fitopatógenas en hojas

de plantas de morera (*Morus alba*), utilizadas como alimento en la producción de gusanos de seda.

Finalmente, las rizobacterias identificadas en el género *Pseudomonas* son consideradas importantes agentes de biocontrol debido a su capacidad de inhibir el desarrollo de bacterias, hongos, nemátodos y virus, que infectan y reducen considerablemente el rendimiento de las cosechas en cultivos de invernadero y campo. Los reportes acerca del biocontrol de cepas pertenecientes al complejo *P. fluorescens* indican que los beneficios se deben a la producción de metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas, como 2,4-diacetilfluoroglucinol (2,4-DAPG), 2-hexilo, 5-propilresorcinol, fenazinas y antibióticos basados en sideróforos como la pirrolnitrina (PRN) y la pioluteorina (PLT) (Garrido-Sanz et al., 2017). Las rizobacterias 1BT11, 1BT12 y 3TTR11 relacionadas con el género *Pseudomonas* y aisladas de *T. terniflora* y *T. coronopifolia* presentaron actividad antifúngica hacia *S. maydis* y *Fusarium* sp., así como actividad antimicrobiana hacia *Cmm*. Algunas investigaciones han demostrado que *P. protegens* (1BT11, 1BT12) es una bacteria capaz de colonizar el interior de las raíces de plantas sin provocar daño, promoviendo relaciones mutualistas con el objetivo de protegerla de hongos fitopatógenos mediante la producción de 2,4-DAPG, PLT, PRN, sideróforos, HCN y proteasas extracelulares (Zhang et al., 2020). La cepa 3TTR11 mostró porcentajes de identidad superiores del 99.5% con *Pseudomonas* sp., *P. extremaustralis*, *P. marginalis* y *P. rhodesiae*, no obstante, solamente la última especie ha sido descrita como una bacteria promotora del crecimiento vegetal, además de solubilizar fósforo, producir sideróforos, ácido indol acético (IAA) y presentar actividad deaminasa ACC y tolerancia a cadmio (Rolón-Cárdenas et al., 2021).

CONCLUSIONES

En conclusión, podemos mencionar que el aislamiento de rizobacterias a partir de la rizosfera de plantas alelopáticas de las especies *T. coronopifolia* y *T. terniflora*,

permitió observar una diferencia estadísticamente significativa en la cantidad de bacterias cultivables aisladas y que la abundancia de bacterias varía mayormente conforme al sitio de aislamiento que con el tiempo de crecimiento de la planta, sin embargo, existe evidencia científica que sugiere una variación de los patrones de exudación de metabolitos secundarios conforme a la etapa fenológica de la planta, lo cual puede modificar la estructura y tamaño de las poblaciones microbianas rizosféricas, y esto, utilizarlo en su beneficio, dependiendo de sus necesidades fisiológicas. Asimismo, la selección e identificación de rizobacterias de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* con actividad antagónica *in vitro* sobre los fitopatógenos *S. maydis*, *Fusarium* sp., y *Cmm* y las cuales posiblemente se encuentran en asociación simbiótica con las plantas en estudio, se les podría atribuir un potencial uso en el control biológico de enfermedades y plagas en plantas de importancia agroeconómica.

REFERENCIAS

- Berg, G., Krechel, A., Ditz, M., Sikora, R.A., Ulrich, A. y Hallmann, J. 2005. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Ecology*. 51(2): 215-229.
- Cawoy, H., Bettiol, W., Fickers, P. y Ongena, M. 2011. Bacillus-based biological control of plant diseases. In *Pesticides in the Modern World – Pesticides Use and Management*. Stoytcheva, M. (ed.). Rijeka, Croatia: InTech, pp. 274-302.
- Cheng, J., Jin, H., Zhang, J., Xu, Z., Yang, X., Liu, H., Xu, X., Min, D., Lu, D. y Qin, B. 2022. Effects of allelochemicals, soil enzyme activities, and environmental factors on rhizosphere soil microbial community of *Stellera chamaejasme* L. along a growth-coverage gradient. *Microorganisms*. 10(1): 158.
- Cicevan, R., Al Hassan, M., Sestras, A.F., Prohens, J., Vicente, O., Sestras, R.E. y Boscaiu, M. 2016. Screening for drought tolerance in cultivars of the ornamental genus *Tagetes* (Asteraceae). *PeerJ*. 4: e2133.
- David, A.S., Thapa-Magar, K.B. y Afkhami, M.E. 2018. Microbial mitigation–exacerbation continuum: a novel framework for microbiome effects on hosts in the face of stress. *Ecology*. 99: 517-523.
- Doornbos, R.F., van Loon, L.C. y Bakker, P.A.H.M. 2012. Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review. *Agronomy for Sustainable Development*. 32: 227-243.
- Fang CX, Yang LK, Chen WS, Li LL, Zhang PL, Li YZ, He HB, Lin WX. MYB57 transcriptionally regulates MAPK11 to interact with PAL2;3 and modulate rice allelopathy. *J Exp Bot*. 2020;71(6):2127–41.
- Gakuubi, M.M., Wagacha, J.M., Dossaji, S.F. y Wanzala, W. 2016. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Tagetes minuta* (Asteraceae) against selected plant pathogenic bacteria. *International Journal of Microbiology*. 7352509.
- García-Sánchez, F., López-Villafranco, M.E., Aguilar-Rodríguez, S. y Aguilar-Contreras, A. 2012. Etnobotánica y morfoanatomía comparada de tres especies de *Tagetes* que se utilizan en Nicolás Romero, Estado de México. *Botanical Sciences*. 90(3): 221-232.
- Garrido-Sanz, D., Arrebola, E., Martínez-Granero, F., García-Méndez, S., Muriel, C., Blanco-Romero, E., Martín, M., Rivilla, R. y Redondo-Nieto, M. 2017. Classification of isolates from the *Pseudomonas fluorescens* complex into phylogenomic groups based in group-specific markers. *Frontiers in Microbiology*. 8: 413.
- Haldar, S., Sengupta, S. 2015. Plant-microbe cross-talk in the rhizosphere: Insight and Biotechnological Potential. *The Open Microbiology Journal*. 9: 1-7.
- Handelsman, J. y Stabb, E.V. 1996. Biocontrol of soilborne plant pathogens. *The Plant Cell*. 8(10): 1855-1869.
- Hernández, T., Leon, D., Rives, N., Diaz, A., Almaguer, M. y Acebo, Y. 2010. Identificación de aislamientos autóctonos de *Pseudomonas fluorescens* con actividad antagónica de *Curvularia* spp. *Protección Vegetal*. 25(3):181-189.
- Hoan, L.T. y Davide, R.G. 1979. Nematicidal properties of root extracts of seventeen plant species on *Meloidogyne incognita*. *Philippine Agriculturist*. 62: 285-295.
- Hooks, C.R.R., Wang, K.H., Ploeg, A., McSorley, R. 2010. Using marigold (*Tagetes* spp.) as a cover crop to protect crops from plant-parasitic nematodes. *Applied Soil Ecology*. 46(3): 307-320.
- Jeffers, D. 1995. Maize Pathology. In: CIMMYT 1997. *Maize Research in 1995-96*. Maize Program Special Report. México, D. F. pp. 39-41.
- Kloepper, J.W. y Ryu, C.M. 2006. Bacterial endophytes as elicitors of induced systemic resistance. In: Schulz B.J.E., Boyle C.J.C., Sieber T.N. (eds) *Microbial Root Endophytes*. Soil Biology, vol 9. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA Sequencing. In: Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., Eds., *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic*, John Wiley and Sons, New York, 115-175.
- Loeffler, W., Tschen, S.M., Vamittanakoon, N., Kugler, M., Knorpp, E., Hsieh, T.F. y Wu, T.G. 1986. Antifungal effects of Bacilysin and Fengymycin from *Bacillus subtilis* F-29-3. A comparison with activities of other *Bacillus* antibiotics. *Journal of Phytopathology*. 115: 204-213.
- Loockerman, D.J., Turner, B.L. y Jansen, R.K. 2003. Phylogenetic relationships within the *Tageteae* (Asteraceae) based on nuclear ribosomal ITS and chloroplast *ndhF* gene sequences. *Systematic Botany*. 28 (1): 191-207.
- López-López, E., Mejía, O., Mercado-Flores, Y., Téllez-Jurado, A. y Anducho-Reyes, M.A. 2017. Variation of the bacterial communities in the rhizosphere of three species of the genus *Tagetes* (marigold) over time. *Applied Ecology and Environmental Research*. 15(4):1327-1345.
- Majeed, A., Muhammad, Z. y Ahmad, H. 2018. Plant growth promoting bacteria: role in soil improvement, abiotic and biotic stress management of crops. *Plant Cell Reports*. 37(12): 1599-1609.
- Mares, D., Tosi, B., Poli, F., Andreotti, E. y Romagnoli, C. 2004. Antifungal activity of *Tagetes patula* extracts on some phytopathogenic fungi: ultrastructural evidence on *Pythium ultimum*. *Microbiological Research*. 159(3): 295-304.
- Micallef, S.A., Channer, S., Shiaris, M.P. y Colón-Carmona, A. 2009. Plant age and genotype impact the progression of bacterial community succession in the *Arabidopsis* rhizosphere. *Plant Signaling & Behavior*. 4(8): 777-780.
- Miller, M.P. y Ahrens, J.F. 1969. Influence of growing marigolds, weeds, two cover crops and fumigation on sub-sequent

- populations of parasitic nematodes and plant growth. *Plant Disease Reporter*. 53: 642-646.
- Petatán-Sagahón, I., Anducho-Reyes, M.A., Silva-Rojas, H.V., Arana-Cuenca, A., Tellez-Jurado, A., Cárdenas-Álvarez, I.O. y Mercado-Flores, Y. 2011. Isolation of bacteria with antifungal activity against the phytopathogenic fungi *Stenocarpella maydis* and *Stenocarpella macrospora*. *International Journal of Molecular Sciences*. 12(9): 5522-5537.
- Philippot, L., Raaijmakers, J., Lemanceau, P. y Van der Putten, W.H. 2013. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*. 11: 789-799 (2013).
- Qu, T., Du, X., Peng, Y., Guo, W., Zhao, C. y Losapio, G. 2021. Invasive species allelopathy decreases plant growth and soil microbial activity. *PloS one*. 16(2): e0246685.
- Reinoso, Y., Casadesús, L., García, A., Gutiérrez, J. y Álvarez, V. 2006. Aislamiento, selección e identificación de bacterias del género *Bacillus* antagonistas de *Pectobacterium carotovorum*. *Fitosanidad*. 10: 187-191.
- Rodríguez-Mejía, M.L. 2013. Biogeografía y manejo integrado de *Clavibacter michiganenses* subsp. *michiganenses* en México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, Vol.31 (Suplemento).
- Rolón-Cárdenas, G. A., Arvizu-Gómez, J. L., Pacheco-Aguilar, J. R., Vázquez-Martínez, J. y Hernández-Morales, A. 2021. Cadmium-tolerant endophytic *Pseudomonas rhodesiae* strains isolated from *Typha latifolia* modify the root architecture of *Arabidopsis thaliana* Col-0 in presence and absence of Cd. *Brazilian journal of microbiology*: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]. 52(1): 349-361.
- Salehi, B., Valussi, M., Morais-Braga, M., Carneiro, J., Leal, A., Coutinho, H., Vitalini, S., Kępiel, D., Antolak, H., Sharifi-Rad, M., Silva, N., Yousaf, Z., Martorell, M., Iriti, M., Carradori, S. y Sharifi-Rad, J. 2018. *Tagetes* spp. Essential Oils and Other Extracts: Chemical Characterization and Biological Activity. *Molecules* (Basel, Switzerland). 23(11): 2847.
- Siebers, M., Rohr, T., Ventura, M., Schütz, V., Thies, S., Kovacic, F., Jaeger, K. E., Berg, M., Dörmann, P. y Schulz, M. 2018. Disruption of microbial community composition and identification of plant growth promoting microorganisms after exposure of soil to rapeseed-derived glucosinolates. *PloS one*. 13(7): e0200160.
- Siddiqui, M.A. y Alam, M.M. 1987. Utilization of marigold plant wastes for the control of plant parasitic nematodes. *Biological Wastes*. 21:221-229.
- Sturz, A. y Kimpinski, J. 2004. Endoroot bacteria derived from marigolds (*Tagetes* spp.) can decrease soil population densities of root-lesion nematodes in the potato root zone. *Plant and Soil*. 262: 241-249.
- Topp, E., Millar, S., Bork, H. y Welsh, M. 1998. Effects of marigold (*Tagetes* sp.) roots on soil microorganisms. *Biology and Fertility of Soils*. 27: 149-154.
- Utkhede, R. y Koch, C. 2004. Biological treatments to control bacterial canker of greenhouse tomatoes. *BioControl*. 49: 305-313.
- von der Schulenburg, J.H.G., Hancock, J.M., Pagnamenta, A., Sloggett, J.J., Majerus, M.E.N. y Hurst, G.D.D. 2001. Extreme length and length variation in the first ribosomal internal transcribed spacer of ladybird beetles (Coleoptera: Coccinellidae). *Molecular Biology and Evolution*. 18:648-660.
- Xiao, Z.X., Lu, S.G. y Xu, Z.H. 2019. Biochemistry of allelopathic plant residues in soil. *Ekoloji*. 28(107):2997-3006. Article No: e107336.
- Yoshida, S., Hiradate, S., Tsukamoto, T., Hatakeda, K. y Shirata, A. 2001. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. *Phytopathology*. 91(2): 181-187.
- Zhang, Q.X., Kong, X.W., Li, S.Y., Chen, X.J. y Chen, X.J. 2020. Antibiotics of *Pseudomonas protegens* FD6 are essential for biocontrol activity. *Australas. Plant Pathology*. 49: 307-317.
- Zuo, S., Li, X., Ma, Y., Yang, S. 2014. Soil microbes are linked to the allelopathic potential of different wheat genotypes. *Plant Soil*. 378: 49-58.